



Smad3 对非小细胞肺癌 A549 细胞和 宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响

韦荣飞, 李梦媛, 杨星九, 朱瑞敏, 徐大模, 高 苒*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 过表达、敲低或抑制 Smad3 的活性, 探讨 Smad3 对非小细胞肺癌 A549 细胞和宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响。方法 设计扩增 Smad3 基因全长编码序列 cDNA 的引物, 通过分子克隆技术构建 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体, 同时设计并合成靶向 Smad3 的 siRNA 序列, 在 A549 和 HeLa 细胞中过表达或敲低 Smad3, 或者利用 Smad3 的抑制剂 SIS3 2 μ M 处理细胞, 采用细胞划痕的方法研究 Smad3 对 A549 和 HeLa 细胞迁移的影响。结果 利用分子克隆技术成功构建 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体。过表达 Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。敲低 Smad3 抑制 A549 和 HeLa 细胞的迁移。SIS3 抑制 Smad3 的活性导致 A549 和 HeLa 细胞的迁移速率变慢。结论 Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。

【关键词】 Smad3; 过表达载体; RNA 干扰; SIS3; 细胞迁移

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.003

Effect of Smad3 on cell migration of A549 and HeLa cells

WEI Rong-fei, LI Meng-yuan, YANG Xing-jiu, ZHU Rui-min, XU Da-mo, GAO Ran*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Smad3 on cell migration of A549 and HeLa cells. **Methods** Primers for pCMV-Myc-Smad3 plasmid construction and siRNA targeting Smad3 were designed and synthesized. pCMV-Myc-Smad3 plasmid was constructed with molecular cloning techniques. Overexpression of Smad3 with Myc-tag or silencing of endogenous Smad3, and then scratch assay was used to detect the migration ability of A549 and HeLa cells *in vitro*. **Results** pCMV-Myc-Smad3 plasmid was successfully constructed. Overexpression of Smad3 significantly up-regulated the migration rate of A549 and HeLa cells. Conversely, in the same cells, silencing of endogenous Smad3 or treatment with Smad3 inhibitor, SIS3, down-regulated the migration rate. **Conclusions** Smad3 promotes cell migration of A549 and HeLa cells.

【Key words】 Smad3; Overexpression vector; RNAi; SIS3; Cell migration

TGF- β (transforming growth factor beta, 转化生长因子 β) 信号通路是调节细胞生长的重要的信号通路, 机体对 TGF- β 信号通路响应的敏感性降低, 将会导致肿瘤的形成^[1]。经典的 TGF- β 信号通路由

【基金项目】 协和青年基金资助, 中央高校基本科研业务费专项资金资助(3332016077); 中国医学科学院医学实验动物研究所基本科研业务费专项资金资助(2016ZX310033); 北京市优秀人才培养项目(2015000020124G073)。

【作者简介】 韦荣飞(1990-), 女, 助理研究员, 研究方向: 免疫与肿瘤。E-mail: weirongfei2010@163.com

【通讯作者】 高苒(1980-), 女, 副研究员, 研究方向: 肿瘤学、免疫学。E-mail: gaoran26@hotmail.com

TGF- β I 型和 II 型受体 (TGFBR1, TGFBR2) 介导, TGFBR1 和 TGFBR2 与 TGF- β 结合后能够磷酸化下游 R-Smads (receptor-activated Smads) 蛋白, 包括 Smad2 和 Smad3^[2,3]。激活的 R-Smads 蛋白随后与 Smad4 结合并转移至细胞核中调控基因的转录^[4-6]。正常的生理条件下, 在多种组织器官中, 包括乳房组织, Smad3 能够抑制细胞的增殖并促进细胞凋亡, 而在乳腺癌晚期, Smad3 能够促进乳腺癌细胞的转移^[7]。2015 年, Rodney B Luwor 等在 *Molecular Cancer* 杂志发表文章揭示, 与非迁移细胞相比, 迁移的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中, Smad3 具有更高的活性^[8]。除了乳腺癌细胞, Smad3 是否也能影响其他类型的癌细胞的迁移呢? 为探讨该科学问题, 我们通过构建 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体, 检测过表达 Smad3 后对宫颈癌 HeLa 细胞和非小细胞肺癌 A549 细胞迁移的影响。同时, 通过 RNAi 干扰及 Smad3 抑制 SIS3 处理细胞敲低 Smad3 的蛋白水平或抑制 Smad3 的活性, 进一步验证 Smad3 对宫颈癌 HeLa 细胞和非小细胞肺癌 A549 细胞迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞及主要试剂

载体构建 PCR 引物由上海维基生物科技有限公司合成; Taq polymerase、dNTP 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 限制性内切酶 Sal I、Not I 及 T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司; 感受态细胞 DH5 α 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 质粒提取盒购自德国 Qiagen 公司; 胎牛血清、DMEM、胰酶购自美国 Gibco 公司; RIPA 裂解液购自 Sigma 公司; 蛋白 Marker 及发光底物购自 Thermo 公司; Lipofectamine 2000 及 RNAiMax 转染试剂购自 Life Technologies 公司。HEK-293T、HeLa 和 A549 细胞系为本实验室所冻存。

1.2 实验方法

1.2.1 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体的构建

1.2.1.1 Smad3 DNA 目的片段的获得

提取 HeLa 细胞的总 RNA, 并进行 cDNA 扩增; 根据 CDS 序列 (NM_005902.3) 设计含有 Sal I 和 Not I 限制性内切酶位点的引物序列; 以反转录的 Smad3 cDNA 作为模板, 扩增 Smad3 DNA 目的片段, 条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物

进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下切割含有目的条带的凝胶块, 利用凝胶回收试剂盒回收目的片段。

1.2.1.2 酶切

利用 Sal I 和 Not I 限制性内切酶对 PCR 获得的 Smad3 DNA 目的片段及 pCMV-Myc-vector 进行酶切, 酶切条件为 37 $^{\circ}$ C 过夜。将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下切割含有目的条带的凝胶块, 利用凝胶回收试剂盒回收目的片段。

1.2.1.3 连接及转化

利用 T4 DNA 连接酶将酶切回收后的 Smad3 DNA 片段和线性 pCMV-Myc-vector 进行连接, 连接条件为 16 $^{\circ}$ C 过夜。连接产物转化感受态 DH5 α 细胞, 在含有氨苄霉素的 LB 平板上筛选克隆。挑取阳性克隆, 过夜摇菌扩增。

1.2.1.4 质粒提取、酶切鉴定及测序

利用质粒提取试剂盒提取阳性菌中的质粒。采用 Sal I 和 Not I 限制性内切酶对重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 进行双酶切鉴定, 并以 1% 琼脂糖凝胶电泳验证片段大小, 同时对重组质粒进行基因测序鉴定。

1.2.1.5 HeLa 细胞和 A549 细胞的培养

HEK-293T、HeLa 和 A549 细胞培养基为含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 高糖培养基。培养于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的细胞培养箱。

1.2.1.6 质粒的表达检测

用胰酶将 HEK-293T 细胞消化成单细胞悬液并对 24 孔板进行铺板, 24 h 后, 通过 Lipofectamine 2000 将 0.8 μ g 的 pCMV-Myc-vector 和重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 分别转染。24 h 后, RIPA 裂解液裂解细胞, 加入等体积的 2 \times loading buffer, 沸水煮 15 min, 得到蛋白样品。随后利用 Myc 标签抗体进行 Western blot 检测重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 的表达情况。

1.2.2 划痕实验

用胰酶将 HeLa 和 A549 细胞消化成单细胞悬液并对 6 孔板进行铺板, 24 h 后, 通过 Lipofectamine 2000 或 RNAiMax 转染试剂将 3 μ g 的重组质粒 pCMV-Myc-Smad3 或 Smad3 的 siRNA 分别进行转染。40 h 后, 用 20 μ L 枪头沿直线对 6 孔板中长满的细胞进行划痕, 0 h、24 h 及 48 h 时分别拍照记录细胞的迁移情况。Smad3 抑制剂 SIS3 (工作浓度 2 μ M) 加入细胞培养基中培养细胞, 划痕及记录方法同上。

1.3 统计学方法

细胞迁移划痕实验每个时间点随机选取 5 个视野拍照,并利用 ZEN 2 软件测量划痕间距,以时间点 0 h 划痕宽度作为标准即 100%,其他时间点划痕间距与 0 h 划痕间距的比值即为该时间点划痕两侧的相对距离(百分比),相对距离越小,则说明相对迁移速率越大。利用 Graphpad Prism 7 对结果进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体的构建

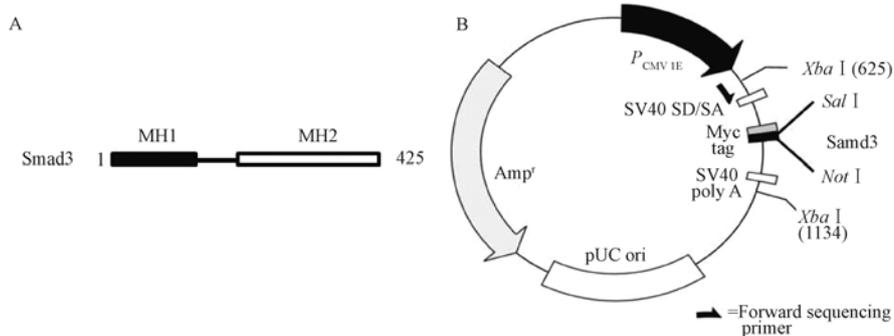
Smad3 蛋白由 425 个氨基酸组成,其主要包含两个结构域:MH1 和 MH2 结构域(图 1A)。MH1 和 MH2 对于 Smad3 正常生物学功能的发挥至关重要。我们以 cDNA 作为模板,用引物 Smad3-F/R(表 1)进行扩增,选择 Sal I 和 Not I 分别为上下游内切酶

切割位点(图 1B),得到与预期片段大小相符的特异性片段(图 2A)。利用 Sal I 和 Not I 对 PCR 产物进行酶切后,通过 T4 DNA 连接酶将酶切产物连接至 pCMV-Myc 载体上。经测序比对及图 2B 酶切鉴定结果显示,Smad3 DNA 全长片段已成功插入 pCMV-Myc 载体上。如图 2C,Western blot 结果显示,与 HEK-293T 细胞中只转染了 Myc-vector 的对照组相比,转染 Myc-Smad3 过表达质粒 24 h 后,在约 55 kDa 大小处检测到 Smad3 的过表达条带,表明 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建成功。

表 1 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建所需引物

Tab. 1 Primers for pCMV-Myc-Smad3 plasmid construction

基因名称 Name	序列 Sequence	酶切位点 Cleavage site
Smad3	F 5'-atagtcgacaatgtctccatctg-3'	Sal I
	R 5'-tatgcggcgcctaagacacactgga-3'	Not I

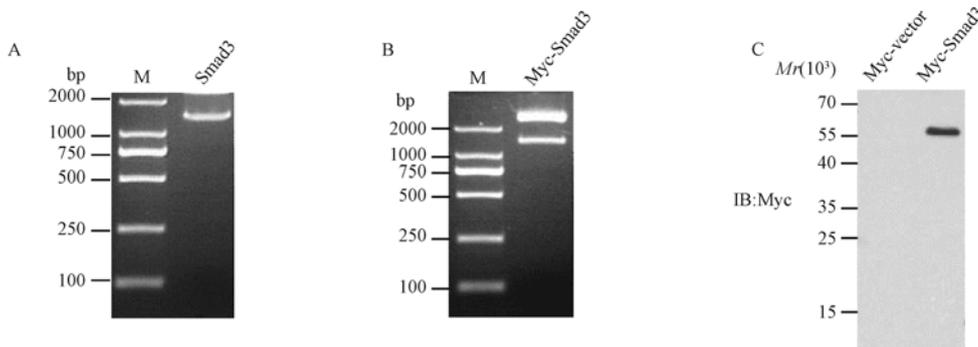


注:(A)为 Smad3 蛋白的结构示意图,主要包括 MH1 和 MH2 结构域;(B)为 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建示意图,其中,选取 Sal I 和 Not I 分别为上下游限制性内切酶切割位点。

图 1 Smad3 蛋白和 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体构建示意图

Note. (A) indicates the structure diagram of Smad3, including MH1 and MH2 domain; (B) indicates the plasmid profile of pCMV-Myc-Smad3.

Fig. 1 Structure diagram of Smad3 and pCMV-Myc-Smad3 plasmid construction.



注:(A)为利用引物 Smad3-F/R 扩增 Smad3 DNA 片段;(B)为 Sal I/Not I 酶切鉴定 pCMV-Myc-Smad3 质粒;(C)为 HEK-293T 细胞中转染 pCMV-Myc-Smad3 过表达质粒, Myc-vector 作为阴性对照,利用 Myc 标签抗体进行 Western blot 检测 Smad3 的过表达情况。

图 2 pCMV-Myc-Smad3 过表达载体的构建及蛋白表达检测

Note. (A) indicates PCR for amplification of Smad3 DNA; (B) indicates the restriction enzyme digestion for pCMV-Myc-Smad3 by Sal I + Not I; (C) indicates the detection of protein expression level of pCMV-Myc-Smad3 in HEK-293T by Western blot.

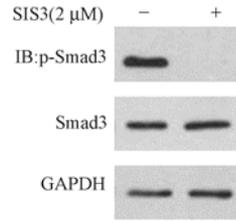
Fig. 2 Construction of pCMV-Myc-Smad3 plasmid

2.2 Smad3 抑制剂 SIS3 对非小细胞肺癌 A549 细胞和人宫颈癌 HeLa 细胞迁移的影响

SIS3 是 Smad3 的抑制剂,其能有效抑制 Smad3 的磷酸化,进而阻止 Smad3 进入细胞核参与基因的转录调控。为研究 SIS3 对细胞迁移的影响,首先在 A549 细胞中检测 SIS3 对 Smad3 的抑制作用,以证明 SIS3 的活性。如图 3 所示,SIS3 能够有效抑制 Smad3 的磷酸化。与 DMSO 处理组相比,含 2 μM SIS3 的 DMEM 培养基培养细胞,划痕后 0、24、48 h, A549(图 4A)和 HeLa(图 4B)细胞迁移结果显示, SIS3 能够有效抑制细胞的迁移。

2.3 敲低或过表达 Smad3 对 A549 和 HeLa 细胞迁移的影响

如图 5 所示,与对照组相比,通过 RNAi 干扰技术敲低 A549(图 5A)和 HeLa(图 5B)细胞中内源的 Smad3 后,划痕后 0、24、48 h 细胞迁移结果显示,敲低 Smad3 明显抑制细胞的迁移。相反,在 A549(图 5A)和 HeLa(图 5B)细胞中过表达 Smad3,划痕后 0、24、48 h 细胞迁移结果显示,过表达 Smad3 明显



注:上图 Western blot 检测 A549 细胞中 Smad3 抑制剂 SIS3 对 Smad3 活性(磷酸化)的抑制作用。

图 3 Smad3 抑制剂 SIS3 对 Smad3 活性的抑制效应

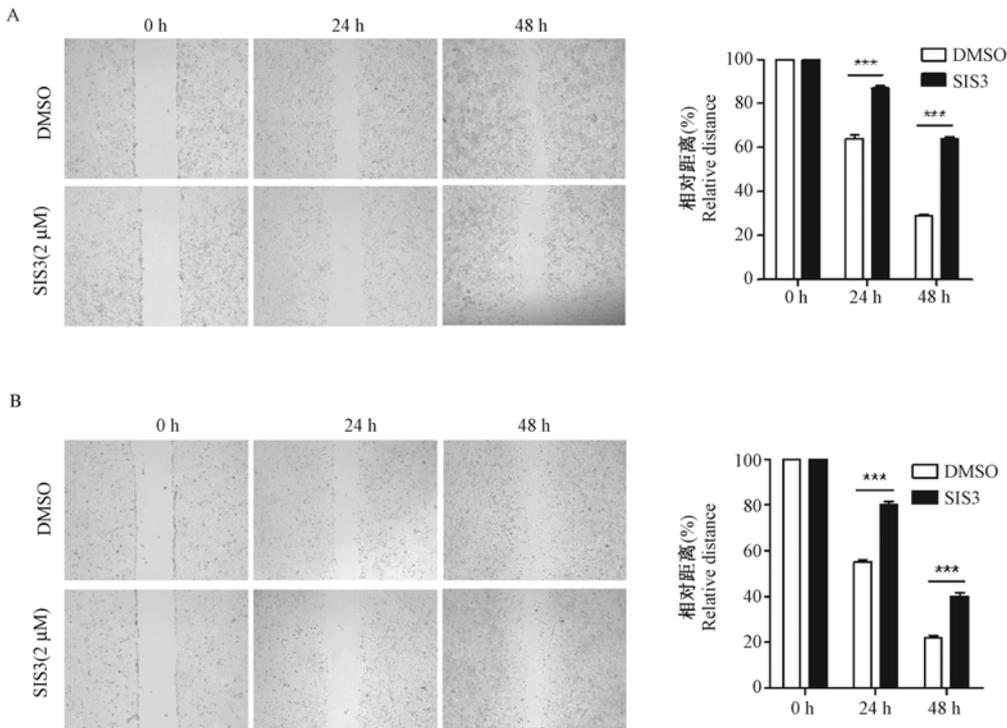
Note. The above result shows the inhibitor of Smad3, SIS3, has significant inhibitory effect on Smad3 activity.

Fig. 3 The inhibitory effect of SIS3 on Smad3

促进细胞迁移。以上结果表明,Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。

3 讨论

癌症是导致人类死亡的主要疾病之一,其中,约 90% 以上的癌症患者死于癌细胞的转移。近年来,人们对肿瘤形成的分子机制展开了大量的研究,为人类治疗癌症提供了多个潜在的治疗靶点^[9-11]。

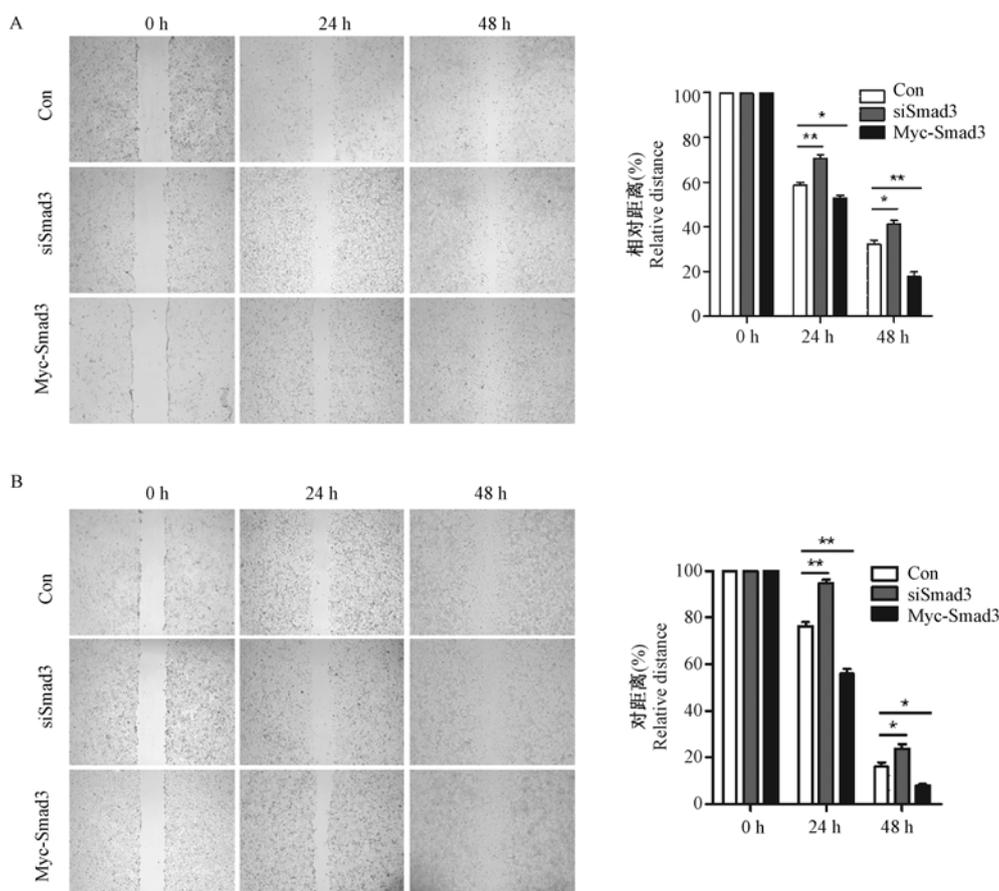


注:上图分别为 2 μM SIS3 处理 A549 细胞(A)和 HeLa 细胞(B)后进行划痕,0、24、48 h 时拍照观察细胞的迁移情况并进行统计学分析,DMSO 处理组作为对照组。与对照组比较,* P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001。

图 4 Smad3 抑制剂 SIS3 能够有效抑制 A549 细胞和 HeLa 细胞的迁移

Note. The above results indicate the inhibitor of Smad3, SIS3, significantly inhibits cell migration of A549 (A) and HeLa (B) cells; * P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001, compared with the normal group.

Fig. 4 The inhibitory effect of SIS3 on cell migration of A549 and HeLa cells



注:上图分别为 A549 细胞(A)和 HeLa 细胞(B)中敲低或过表达 Smad3 后进行划痕,0、24、48 h 时拍照观察细胞的迁移情况并进行统计学分析,Con 组作为对照组。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图 5 敲低或过表达 Smad3 能够明显抑制或促进 A549 细胞和 HeLa 细胞的迁移

Note. The above results show silencing of endogenous Smad3 or overexpression of Smad3 in A549 (A) or HeLa (B) cells can effectively inhibits or promotes cell migration; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with the normal group.

Fig. 5 Knockdown or overexpression of Smad3 inhibits or promotes cell migration

前期报道揭示,TGF- β 与多种肿瘤的发展密切相关,包括神经胶质瘤、乳腺癌等^[12-14]。在正常的生理条件下,TGF- β 信号能够抑制上皮细胞的增殖,然而,在肿瘤的发展进程中,TGF- β 则诱导肿瘤细胞的增殖、侵袭及血管生成^[15,16]。Smad3 是 TGF- β 信号通路中的一个重要分子,前期报道揭示,在乳腺癌晚期,Smad3 异常活化,促进乳腺癌细胞的转移^[7,8]。SIS3 作为 Smad3 的抑制剂,能够抑制 TGF- β 1 诱导的 Smad3 的磷酸化及 Smad3-Smad4 的相互作用,进而抑制相关基因的转录^[17]。本研究通过过表达、敲低 Smad3 或利用 SIS3 处理 A549 和 HeLa 细胞抑制内源 Smad3 的活性,然后检测细胞迁移能力的变化,从而阐明 Smad3 对非小细胞肺癌和宫颈癌细胞迁移的影响,结果显示,Smad3 促进 A549 和 HeLa 细胞的迁移。Smad3 调控细胞迁移的详细作用机制有待深入研究。

综上所述,结合前期相关报道,我们发现,Smad3 不仅能够促进乳腺癌细胞的迁移,也能促进非小细胞肺癌和宫颈癌细胞的迁移。这提示,在人类多种肿瘤类型中,Smad3 促进肿瘤细胞的迁移具有一定的普遍性。因此,后续靶向 Smad3 活性抑制药物的开发将具有很大的临床应用前景,也为肿瘤治疗提供新的途径。

参考文献:

[1] David CJ, Huang Y-H, Chen M, *et al.* TGF- β Tumor Suppression through a Lethal EMT [J]. Cell, 2016, 164(5): 1015 - 1030.
 [2] Abdollah S, Macías-Silva M, Tsukazaki T, *et al.* T β RI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling [J]. J Biol Chem, 1997, 272(44): 27678 - 27685.

(下转第 21 页)

- [19] Lacouture ME, Lai SE. The PRIDE (Papulopustules and/or paronychia, Regulatory abnormalities of hair growth, Itching, and Dryness due to Epidermal growth factor receptor inhibitors) syndrome[J]. Br J Dermatol, 2006, 155(4):852-854.
- [20] Guttman-Yassky E, Mita A, De Jonge M, et al. Characterisation of the cutaneous pathology in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with the EGFR tyrosine kinase inhibitor erlotinib [J]. Eur J Cancer, 2010, 46(11):2010-2019.
- [21] Romero Q, Bendahl PO, Klintman M, et al. Ki67 proliferation in core biopsies versus surgical samples-a model for neo-adjuvant breast cancer studies[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1):341.
- [22] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(2):174-183.

[收稿日期]2016-06-13

(上接第 15 页)

- [3] Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engström U, et al. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor- β signaling [J]. J Biol Chem, 1997, 272(44):28107-28115.
- [4] Shi Y, Hata A, Lo RS, et al. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4 [J]. Nature, 1997, 388(6637):87-93.
- [5] Chacko BM, Qin B, Correia JJ, et al. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization [J]. Nat Struct Mol Biol, 2001, 8(3):248-253.
- [6] Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF- β signaling [J]. Mol Cell, 2004, 15(5):813-823.
- [7] Liu F, Xie W, Liu Z, et al. Role of Smad3 linker phosphorylation in breast cancer progression [J]. Cancer Res, 2015, 75(15 Supplement):4940-4940.
- [8] Luwor RB, Hakmana D, Iaria J, et al. Single live cell TGF- β signalling imaging: breast cancer cell motility and migration is driven by sub-populations of cells with dynamic TGF- β -Smad3 activity [J]. Mol Cancer, 2015, 14(1):1.
- [9] Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models [J]. Nature Rev Genet, 2001, 2(2):120-129.
- [10] Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, et al. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research [J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36(3):206-215.
- [11] Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment [J]. Trends Pharmacol Sci, 2003, 24(2):96-102.
- [12] Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer [J]. J Cell Physiol, 2001, 186(2):153-168.
- [13] Rich J. The role of transforming growth factor-beta in primary brain tumors [J]. Front Biosci, 2003, 8:245-260.
- [14] Korpál M, Yan J, Lu X, et al. Imaging transforming growth factor- β signaling dynamics and therapeutic response in breast cancer bone metastasis [J]. Nat Med, 2009, 15(8):960-966.
- [15] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling [J]. Nature, 2003, 425(6958):577-584.
- [16] Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(11):807-820.
- [17] Jimin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor- β 1-induced extracellular matrix expression [J]. Mol Pharmacol, 2006, 69(2):597-607.

[收稿日期]2016-06-14